



In silico modification of the isopentenyl pyrophosphate isomerase 1 enzyme from Stevia rebaudiana useful for metabolic regulation study

Modificación *in silico* de la enzima isopentenil pirofosfato isomerasa 1 de *Stevia rebaudiana* útil para el estudio de regulación metabólica

Oscar Gregorio-Ramírez¹, Ariana Arlene Huerta-Heredia², Edgar García-López^{1*}

¹Laboratorio de Células y Cultivo de Tejidos vegetales y Biología Molecular de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, Instituto de Biotecnología, División de Estudio de Posgrado. Oax. México C.P. 68301. ²Cátedras CONACyT-UNPA.

*Corresponding author.

E-mail address: egarcia@unpa.edu.mx (E. García-López).

Article history:

Received: 14 December 2016 / Received in revised form: 26 May 2017 / Accepted: 17 June 2017 /

Published online: 1 July 2017

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.2.161>

ABSTRACT

Stevia rebaudiana is a plant commonly used as a source of natural sweeteners obtained from its leaves and stems that give the characteristic intense sweetness due to the accumulation of compounds known as steviol glycosides (SGs). These compounds are used as a substitute for sucrose and offer health benefits due to its low content in calories, added to antihypertensive and anti-cancer properties, etc. The SGs are produced via the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway using isoprenoids as precursors. This route is specific to chloroplasts and currently it is known relatively little about its regulation and the mechanisms that direct metabolic fluxes in convergent points of biosynthetic routes, one of those important points of regulation is the catalyzed by the enzyme isopentenyl pyrophosphate isomerase 1 (IPI1). The present study reports the modification and *in silico* design of the messenger RNA corresponding to IPI1, through the change of a methionine by leucine at the position 141 (M141L) of the sequence reported for *S. rebaudiana*. In addition, the nucleotide sequence codonic usage was optimized to improve its expression efficiency. Finally, homology modelling analyses were performed to the sequence to obtain a putative model of the modified enzyme and study its interaction with ligands and substrate. This modified sequence will be useful for studying the metabolic regulation that is exerted on the production of GEs in *S. rebaudiana*.

Keywords: Steviol glycosides, homology modelling, *in silico* design, metabolic engineering.

RESUMEN

Stevia rebaudiana es una planta comúnmente empleada como fuente de edulcorantes naturales a partir de sus hojas y tallos, dando el característico sabor dulce intenso debido a la acumulación de los

compuestos llamados glucósidos de esteviol (GEs). Estos compuestos son usados como sustituto de azúcar de caña y ofrecen beneficios a la salud por su contenido bajo en calorías, propiedades anticancerígenas, antihipertensivas, entre otras. Los GEs son producidos a partir de la ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato utilizando isoprenoides como precursores. Esta ruta es específica de cloroplastos y actualmente se conoce relativamente poco sobre su regulación y los mecanismos que dirigen los flujos metabólicos en puntos convergentes de rutas biosintéticas, uno de esos puntos importantes de regulación es el catalizado por la enzima isopentenil pirofostato isomerasa 1 (IPI1). En el presente estudio se aborda la modificación y diseño *in silico* del mensajero correspondiente a esta proteína a través del cambio de una metionina por leucina en la posición 141 (M141L) de la secuencia reportada para *S. rebaudiana*. Adicionalmente, la secuencia nucleotídica fue sometida a optimización de uso codónico para mejorar su eficiencia de expresión. Por último, se realizaron análisis de modelado por homología de la secuencia modificada para obtener un modelo putativo de la enzima modificada y estudiar sus interacciones con ligandos y el sustrato. Esta secuencia modificada será útil para estudiar la regulación metabólica que se ejerce sobre la producción de GEs en *S. rebaudiana*.

Palabras clave: Glucósidos de esteviol, modelado por homología, diseño *in silico*, ingeniería metabólica.

1. INTRODUCCIÓN

Stevia rebaudiana (bertoni) es una planta herbácea dicotiledónea perteneciente a la familia de las Asteraceas. Su sabor es dulce debido a que produce glucósidos de esteviol (GEs) que son edulcorantes naturales (Yadav *et al.*, 2012), cuya capacidad de dulzor en estado puro y cristalino puede ser de 300 a 450 veces mayor que el azúcar de caña (Goyal *et al.*, 2010; Wölwer-Rieck, 2012). Los GEs se sintetizan en el plastidio por la vía 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), a partir del ácido pirúvico y del gliceraldehído 3 fosfato (Kumar *et al.*, 2014). La ruta MEP es una de las vías fundamentales en las plantas que producen gran variedad de isoprenos esenciales (Jarma *et al.*, 2010). La enzima IPI1, clave en la regulación de la ruta, actúa como un modulador de la velocidad de reacción que cataliza a los isómeros electrofílicos isopentenil difosfato (ID) y dimetil alil difosfato (DAD) (Durbecq *et al.* 2001; Berthelot *et al.* 2012) para la síntesis de nuevas moléculas naturales. De acuerdo a la relación molar 3:1 (ID:DAD) favorece la biosíntesis de geranil geranil fosfato, que conduce a la biosíntesis de los GEs (Phillips *et al.* 2008). Actualmente los GEs son utilizados en la fabricación de medicamentos, alimentos y productos nutracéuticos (Garro-Monge *et al.*, 2014).

De forma convencional, la ingeniería metabólica es el mejoramiento de las propiedades celulares de manera racional a través de cambios en las reacciones bioquímicas en la introducción de segmentos de ADN recombinante que constituyen el metabolismo celular (Mitchell *et al.*, 2012). Esta disciplina se ha encargado de facilitar la modificación de flujos metabólicos y regulación enzimática en la modulación de la expresión o en la inactivación de genes para redirigir el flujo de carbono y energía en la producción de compuestos naturales de interés (Zorrilla-López *et al.*, 2013), la mayoría de las veces para aumentar su producción, como por ejemplo los GEs de *Stevia rebaudiana*. Actualmente existen reportes donde se describe la aplicación de la ingeniería metabólica en plantas con el objetivo de generar nuevos compuestos (kyung *et al.*, 2015; Pickens *et al.*, 2011). Sin embargo, el modelado metabólico puede predecir la capacidad biosintética y la regulación en plantas, permitiendo ajustar la eficiencia de producción de metabolitos secundarios.

En el actual estudio se generó una secuencia que incluye un cambio de aminoácidos de la secuencia codificante de la isopentenil pirofostato isomerasa 1 (IPI1), enzima clave de la ruta MEP, a través de optimización de uso codónico y remoción de la secuencias indeseables (Li *et al.*, 2013). Estas modificaciones racionales habitualmente mejoran los niveles de expresión de las proteínas. Por otra parte, la secuencia nucleotídica optimizada fue enviada al servidor I-TASSER para la predicción de la estructura tridimensional hipotética, a través de un modelado por homología (Jianyi *et al.*, 2016). El servidor se encuentra en desarrollo continuo con el objetivo de proporcionar las predicciones estructurales y funcionales más precisas. Todas éstas tareas bioinformáticas se emplean para modificar los rendimientos de las reacciones de la vía metabólica con el propósito de estudiar y evaluar la regulación de la producción de GEs en *S. rebaudiana*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Alineamientos múltiples y análisis filogenético de las IPI1

El diseño *in silico* partió de la secuencia original de IPI1 para *S. rebaudiana* (Número de acceso NCBI KT276235). Con dicha secuencia se realizó búsqueda por homología utilizando la herramienta bioinformática BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), se seleccionaron los IPI1 con la mayor identidad de diferentes plantas dicotiledóneas. Los alineamientos múltiples obtenidos se analizaron en el software MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net>). El árbol filogenético fue generado usando el método de máxima verosimilitud (ML) y una validación de la topología del árbol por remuestreo o bootstrap.

2.2. Análisis de uso codónico

Por otro lado, la secuencia original fue optimizada para su codónico en el software Visual Gene Developer (<http://visualgenedeveloper.net>), utilizando la tabla de uso codónico de *S. rebaudiana* (<http://www.kazusa.or.jp>). Este proceso permitió remplazar algunos codones originales con otros manteniendo la identidad de los aminoácidos; para la selección de la secuencia final se tuvieron en cuenta parámetros como índice de adaptación codónica (CAI), número efectivo de codones (Nc) y el porcentaje de GC, mediante el software. La modificación de la enzima IPI1 en la posición M141L se espera aumentará el potencial de la actividad enzimática. Las modificaciones puntuales a la secuencia se introdujeron usando el software Snap gene (<http://www.snapgene.com>).

2.3. Estructura tridimensional a partir de I-TASSER

El modelado tridimensional por homología de la secuencia modificada se obtuvo a través del servidor I-Tasser que está libremente disponible en internet (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>). El servidor I-Tasser genera una serie de modelos estructurales basados en búsquedas de homología con modelos tridimensionales determinados experimentalmente depositados en bases de datos, los mejores resultados determinan al modelo putativo.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de alineamiento múltiples

Los alineamientos múltiples mostraron que las proteínas comparadas tienen una alta identidad (c.a 85%) y que tienen regiones altamente conservadas (Fig. 1), solamente se muestra una fracción del alineamiento que comprende a las regiones conservadas de la proteína. En el residuo 141 se observó una variación en la secuencia de *S. rebaudiana* con respecto al consenso, un cambio de Met-Leu, que se introdujo en la secuencia diseñada. A continuación se realizó la optimización de uso codónico de la secuencia modificada con la finalidad de aumentar la eficiencia de traducción de la proteína, los valores del índice de adaptación codónico (CAI) pasaron de 0.58 en la secuencia original a 0.59 en la optimizada.

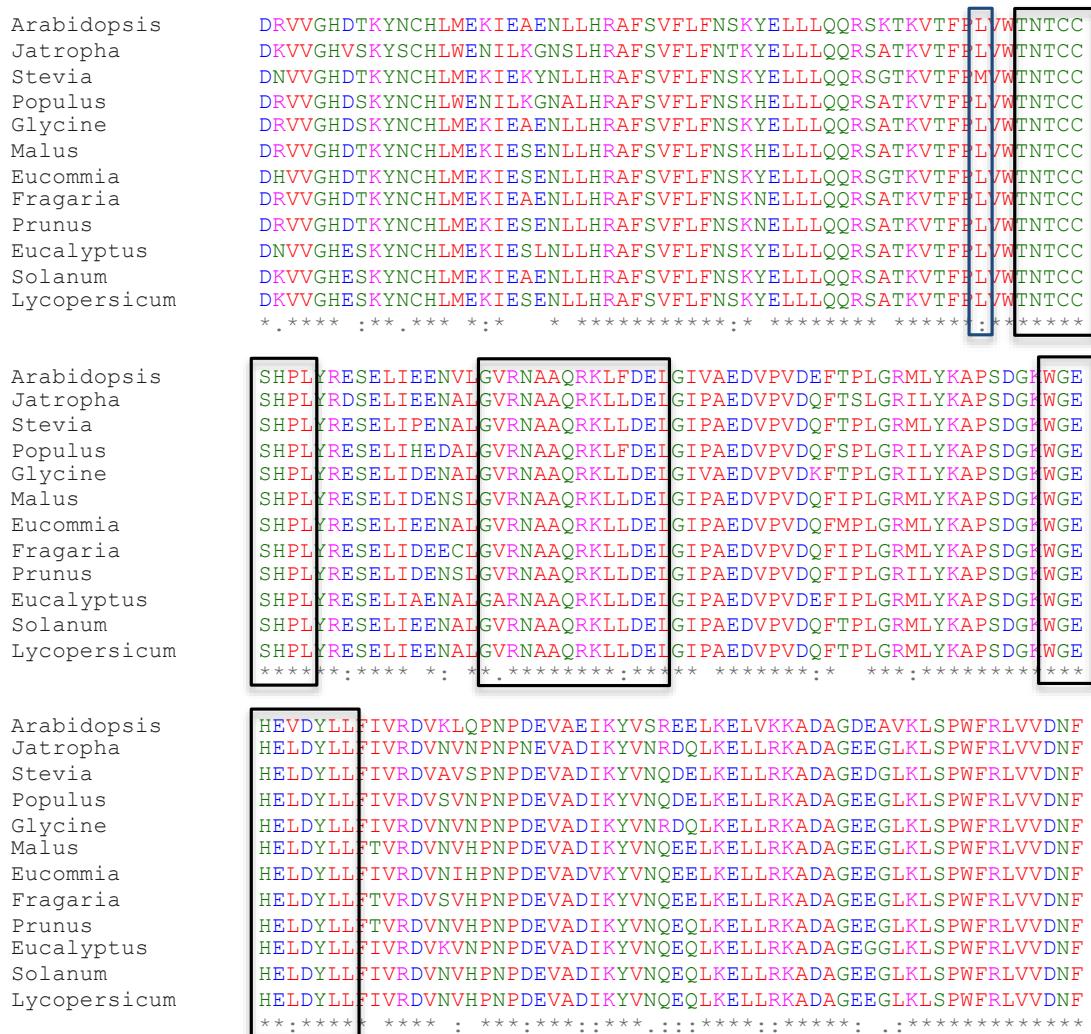


Fig 1. Alineamiento múltiple de la secuencia predicha de IPI1 con las secuencias de otras familias de plantas: *Arabidopsis thaliana* (U47324), *Jatropha curcas* (KJ908689), *Stevia rebaudiana* (kt276235), *Populus trichocarpa* (B3GEM7), *Glycine max* (I1L6A2), *Malus domestica* (XP_008345747), *Eucommia ulmoides* (AB041629), *Fragaria vesca* (XP_004302163), *Prunus persica* (EMJ06840), *Eucalyptus grandis* (A0A059DGB5), *Solanum tuberosum* (M1C547) y *Solanum lycopersicum* (EU253957). Los residuos de aminoácidos mostrados en el recuadro de color negro son altamente conservados, sin embargo se puede observar que en el recuadro de color azul para la mayoría de las plantas se encuentra el aminoácido leucina en contraste *S. rebaudiana* posee el aminoácido metionina, es este sitio donde se introdujo el cambio puntual.

3.2. Construcción del árbol filogenético de IPI1

El árbol evolutivo construido mostró que la secuencia de IPI1 de *S. rebaudiana* es más cercana a la secuencia de *Eucommia ulmoides Oliver* que a las demás secuencias comparadas. Este árbol filogenético se obtuvo mediante el método de máxima verosimilitud, considerando remuestreo o bootstrap (1000 réplicas) para encontrar una estructura que define con mayor probabilidad las distancias evolutivas entre secuencias de las isomerasas comparadas (Fig. 2).

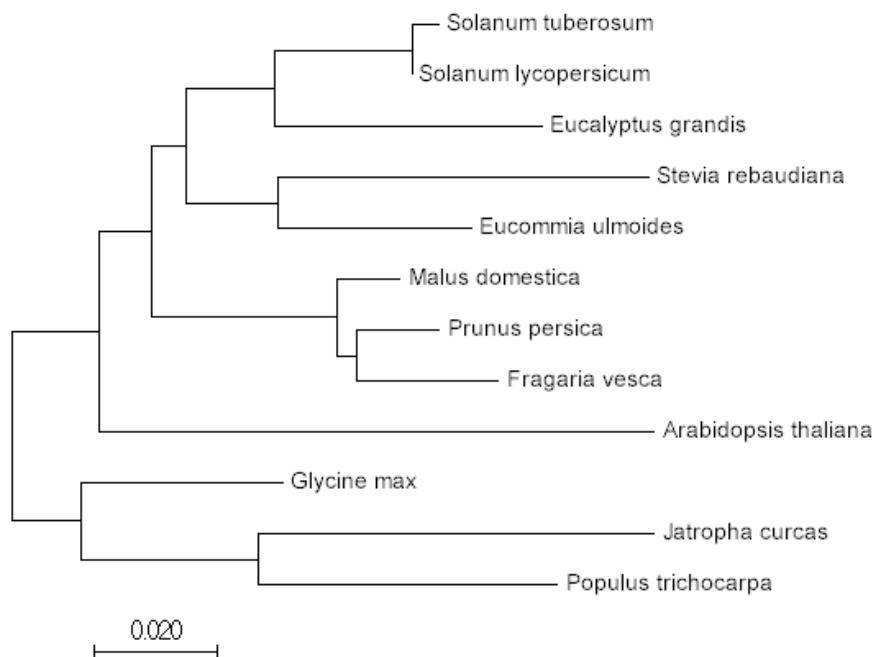


Fig. 2. Árbol filogenético de las proteínas IPI1 en plantas dicotiledóneas. Se obtuvo mediante el programa MEGA 7.0, con remuestreo o bootstrap (1000 réplicas), obteniendo el árbol filogenético con mayor probabilidad de representar la historia evolutiva de las moléculas comparadas.

3.3. Predicción de la estructura tridimensional de IPI1

La secuencia diseñada de IPI1 se mandó a analizar al servidor I-TASSER, (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) del cual se obtuvo una estructura tridimensional hipotética obtenida por homología (Fig. 3A, B, C y D), en esta imagen también se resaltan los sitios de interacción con el Mg²⁺ y el sitio activo de la proteína.

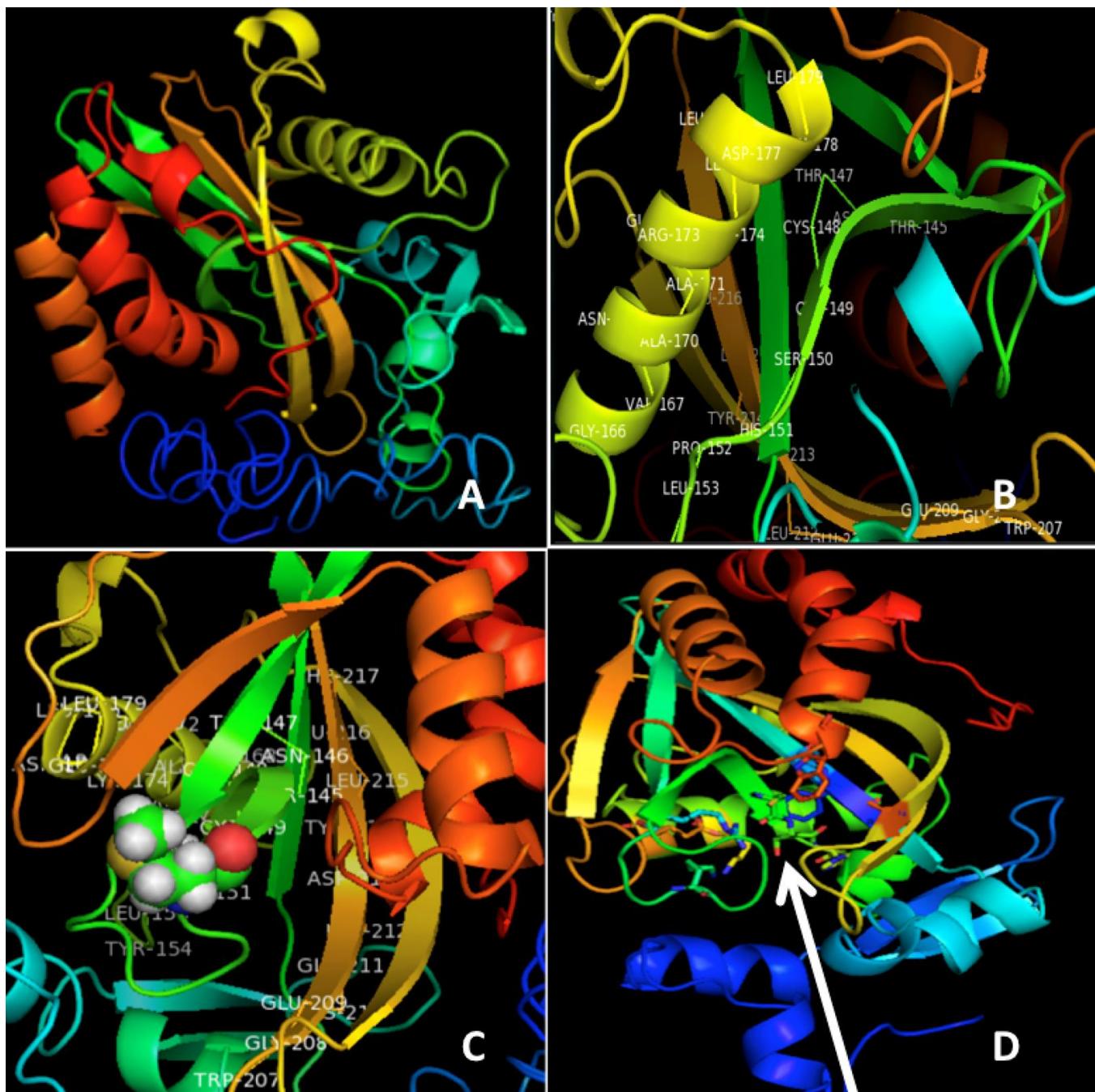


Fig. 3. A) Estructura tridimensional hipotética de IPI1 modificada. B) Regiones de la IPI1 altamente conservada. Mostradas en color amarillo y verde. C) Posición del aminoácido metionina original. Se muestra como diagrama de esferas. D) Sitio de unión a ligando Mg²⁺.

4. DISCUSIONES

Los análisis de búsqueda de identidad realizados mostraron un alto grado de homología con las secuencias de IPI1 en otras plantas dicotiledóneas, resultados similares fueron encontrados en los alineamientos realizados previamente (Berthelot *et al.*, 2012; Wei *et al.*, en 2014). Estos trabajos encontraron regiones altamente conservadas que coinciden con las encontradas en los alineamientos de este estudio comparados con la secuencia de *S. rebaudiana*, aunque en esos estudios se incluyeron secuencias de otros organismos como animales, bacterias y hongos que si mostraron algunos cambios en esas regiones conservadas. Al momento no se encontraron estudios de modificación de uso codónico en IPI1 de Stevia con perspectivas a su expresión heteróloga, no obstante es interesante resaltar que el caso de este estudio se logró una mejora en el valor de CAI aun cuando se partió de una secuencia endógena de Stevia, lo que indica un campo de oportunidad para la mejora de características enzimáticas vía modificación racional. Los alineamientos múltiples de secuencias muestran un alto nivel de homología de la secuencia IPI1 de Stevia con otras plantas dicotiledóneas, particularmente en regiones que han sido reportadas como hiperconservadas y de funcionalidad para la enzima. El valor del parámetro CAI pudo ser mejorado sin llegar a sesgos codónicos o cambio extensivo de aminoácidos aun cuando se hizo sobre una secuencia endógena de la planta. El modelo tridimensional generado por homología mostró las mismas regiones de interacción con ligandos y sustrato que modelos reportados de IPI1 para otros organismos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Julián Mario Peña Castro y Dra. Blanca Estela Barrera. Al proyecto 3212 Cátedra-CONACyT (N° 183958), INFRA CONACyT (N° 255514). Al CONACyT por la beca otorgada al primer autor.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Berthelot K., Estevez Y., Deffieux A. & Peruch F. 2012. Isopentenyl diphosphate isomerase: A checkpoint to isoprenoid biosynthesis. *Journal Biochimie*. 94(1):1621-1634.
- Durbecq V., Sainz G., Oudjama Y., Clantin B., Bompard-Gilles C., Tricot C., Caillet J., Stalon V., Droogmans L. & Villeret V. 2001. Crystal structure of isopentenyl diphosphate: dimethylallyl diphosphate isomerase. *The EMBOL Journal*. 20(1):1530-1537.
- Garro-Monge G., Jimenez-Quesada K.. & Alvarenga-Venuolo. 2014. Molecular-genetic characterization of *Stevia rebaudiana* processed materials using microsatellite technique. *Tecnología en marcha*. 3(1):32-40.
- Goyal SK., Samsher & Goyal RK. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International journal of food sciences and nutrition*. 61(1):1-10.
- Jarma-Orozco A & Miguel CE. 2010. Nutritional aspects and metabolism of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) a review. *Agronomía colombiana* 28(1): 199-208.

- Kumar YS. & Guleria P. 2014. Steviol glycosides from stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical reviews in food science and nutrition.* 52(1):988–998.
- Kyung KM., Kang H-J., Ho KJ., Hwan OS. & Cheon LP. 2015. Metabolic engineering of the *Stevia rebaudiana* ent-kaurene biosynthetic pathway in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology.* 214(1): 95-102.
- Li X., Li S., Lang Z., Zhang J., Zhu L. & Huang D. 2013. Chloroplast-targeted expression of the codon-optimized truncated cry1Ah gene in transgenic tobacco confers a high level of protection against insects. *Plant cell reports.* 8(1):1299-1308.
- Phillips MA., Auria JCD., Gershenzon J. & Pichersky E. 2008. The *Arabidopsis thaliana* type I isopentenyl diphosphate isomerase are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *The plant cell.* 20(1): 677-696.
- Pickens LB., Tang Y. & Chooil Y-H. 2011. Metabolic engineering for the production of natural products. *Annual review of chemical and biomolecular engineering.* 2(1):211-236.
- Wei L., Yin L., Hu X., Ying X. & Chen F. 2014. A novel chloroplastic isopentenyl diphosphate isomerase gene from *Jatropha curcas*: Cloning, characterization and subcellular localization. *Electronic Journal of Biotechnology* 17(1):296–303.
- Wölwer-Rieck U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of agricultural and food chemistry.* 4(1):886-95.
- Yadav SK. & Guleria P. 2012. Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Critical reviews in food science and nutrition.* 52(1):988–998.
- Yang J. & Zhang Y. 2016. Protein structure and fuction prediction using I-TASSER. *Current Protocols Bioinformatics* 52(1): 581–585.
- Zorrilla-López U., Masip G. & Arjó G. 2013. Engineering metabolic pathways in plants by multigene transformation. *The International Journal of Developmental Biology.* 57(1): 565-576.